

Aus der 1. medizinischen Klinik
des städtischen Krankenhauses Nürnberg
Vorstand: Prof. Dr. med. D. Jahn

Über die Atmung von Leberhomogenaten unter Einwirkung von Pyrazolonkörpern.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen

vorgelegt von
Ernst Bardachzi Erlangen

1955



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. medizinischen Klinik
des städtischen Krankenhauses Nürnberg

Vorstand:

Prof.Dr.med. D. Jahn.

Über die Atmung von Leberhomogenaten unter
Einwirkung von Pyrazolonkörpern.

=====

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich Alexander Universität Erlangen

vorgelegt von
Ernst B a r d a c h z i
Erlangen.

Erlangen 1955

- 1.Referent: Prof.Dr.D.Jahn
- 2.Referent: Prof.Dr.F.Heim

Dekan : Prof.Dr.C.Korth

Tag der mündlichen Prüfung : 20.Juli 1956



Inhaltsverzeichnis.

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodik	3
III. Ergebnisse	9
A. Die Leeratmung d. Leberhomogenate .	9
Der Sauerstoffnormverbrauch	9
Die CO ₂ - Bildung	15
Der respiratorische Quotient	16
B. Die Atmung d. Leberhomogenate unter Amidopyrin	17
Der Sauerstoffverbrauch	17
Die CO ₂ - Bildung	24
Der respiratorische Quotient	25
C. Der Sauerstoffverbrauch d. Leber- homogenate unter Einwirkung von Amidopyrin u. Adenosintriphosphor- säure	27
IV. Diskussion	28
V. Anhang	32

ZUSAMMENFASSUNG.

In Erweiterung früherer Untersuchungen, durch die nachgewiesen wurde, daß Pyrazolone einerseits die Umsatzgeschwindigkeit von Fruktose und Diphosphorpyridinnucleotid im Leberhomogenat hemmen, andererseits diese Umsatzverlangsamung durch Cocarboxylase und Vitamin B₁₂ aufgehoben werden kann, untersucht die vorliegende Arbeit die Atmung der Leberhomogenate unter Einwirkung von Pyrazolonkörpern. Es kann gezeigt werden, daß durch Pyrazolone eine Herabsetzung des Sauerstoffverbrauches der Homogenate bewirkt wird, somit also die gefundene Hemmung des Kohlehydratabbaues auch in einer Verminderung des gesamt „oxydativen“ Stoffwechsels zum Ausdruck kommt. Eine Steigerung des durch Pyrazolonkörper verminderten Sauerstoffverbrauches konnte durch Adenosintriphosphorsäure erzielt werden.

Die Frage nach dem Angriffsort der Pyrazolone im Leberstoffwechsel kann auf Grund der Ergebnisse jedoch nur dahingehend beantwortet werden, daß einige Fermentsysteme als Ort der Hemmung näher umschrieben werden können. Zur genauen Bestimmung der durch Pyrazolonkörper unmittelbar angegriffenen Fermente mußte jedoch die Einwirkung dieser Substanz auf enzymatische Einzelreaktionen geprüft werden.

I. E I N L E I T U N G .

.....

In einer Reihe von Veröffentlichungen (1,2) wurde nachgewiesen, daß durch Pyrazolonkörper die Oxydationsgeschwindigkeit des DPN- H_2 (hydriertes Diphosphopyridinnucleotid) in Leberhomogenaten verringert wird. (Hemmung der Oxydation). Darüber hinaus fand sich, daß die Stärke der Hemmung von der Konzentration der zugesetzten Pyrazolone abhängt. Der Hemmung der Oxydation parallel ging eine Verminderung des Zuckerumsatzes.

Der Diskussion dieser Befunde wurde die Hypothese zu Grunde gelegt, daß Pyrazolone eine allgemeine Hemmung des oxydativen Reststoffwechsels der Homogenate bewirken. Diese Hypothese konnte die mangelnde Dehydrierung des DPN/DPN- H_2 - Systems erklären. Sie konnte weiterhin auch die Minderung des Zuckerabbaues deuten, denn das Pyridinnucleotidsystem steht an einer wesentlichen Stelle des intermediären Kohlehydratstoffwechsels.

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich in Erweiterung dieser Untersuchungen mit der Atmungsgröße von Leberhomogenaten unter der Einwirkung von Pyrazolonkörpern.

Sie setzt sich in den verschiedenen Abschnitten mit einer Anzahl von Fragestellungen auseinander, die des Überblicks halber wie folgt formuliert werden sollen:

1. Wie verhält sich die Atmung der Leberhomogenate überhaupt ?

Die normale Atmung und ihre Schwankungen.

Zeitlicher Verlauf und Zeitabschnitt der optimalen Atmung.

2. Wie verhält sich die Atmung der Homogenate unter Zusatz von Pyrazolonkörpern ?

Art der Beeinflussung.

Abhängigkeit der Beeinflussung von der Konzentration der zugesetzten Pyrazolone.

3. Läßt sich die beobachtete Wirkung der Pyrazolone auf die Atmung ihrerseits beeinflussen ?

II. M E T H O D I K .

1. Kurzer Umriss der bei den Versuchen angewandten Methode zur Messung der Gewebsatmung.

Die Versuche werden mit Mäuseleberhomogenaten durchgeführt, deren Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxydbildung manometrisch in der Warburg-Apparatur (Braun / Melsungen, Modell "V") mit Doppelkapillarmanometern und Reaktionsgefäßen unten gezeigten Typs nach der "direkten Methode von Warburg" gemessen wird.

Zur Messung des Sauerstoffverbrauches des Gewebes im Reaktionsgefäß wird bei der direkten Warburgmethode das bei der Atmung gebildete Kohlendioxyd durch Kalilauge absorbiert. Der Ausschlag des an das Reaktionsgefäß angeschlossenen Manometers entspricht dann unter Berücksichtigung der für die herrschenden Versuchsbedingungen und jedes Manometer mit zugehörigem Reaktionsgefäß ermittelten

Konstanten ⁺⁾ dem tatsächlichen O₂-Verbrauch.

Es gilt die Formel:

$$x_{O_2} = h \cdot k_{O_2} \dots\dots\dots 1.$$

wobei:

h = abgelesener Manometerausschlag

k_{O₂} = Gefäßkonstante

x_{O₂} = O₂-Verbrauch in cmm

Die Bestimmung der CO₂-Produktion erfolgt nach der gleichen Methode, wobei die CO₂-Absorption in einer Anzahl von Reaktionsgefäßen unterbleibt. Man erhält so zwei parallel laufende Meßreihen (mit und ohne CO₂-Absorption) und damit:

a) den reinen O₂-Verbrauch

b) die Resultante aus CO₂-Bildung und O₂-Verbrauch

+) Die Konstanten (Gefäßkonstanten) ergeben sich aus der Formel:

$$k = \frac{V_G \frac{273}{T} + V_F \cdot a}{P_0}$$

wobei:

V_G = Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß

V_F = Volumen der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß

a = Absorptionskoeffizient des gemessenen Gases

T = Versuchstemperatur in ° abs.

P₀ = Normaldruck, ausgedrückt in mm der verwendeten Manometerflüssigkeit

Die Gefäßvolumina werden gravimetrisch durch Füllen mit Quecksilber bestimmt.

Die CO_2 -Bildung ergibt sich aus der Formel:

$$x_{\text{CO}_2} = \left(h - \frac{x_{\text{O}_2}}{k_{\text{O}_2}} \right) \cdot k_{\text{CO}_2} \dots\dots\dots 2.$$

wobei:

h = Manometerausschlag des Gefäßes ohne Absorption

x_{O_2} = im Parallelversuch mitbestimmter O_2 - Verbrauch

k_{O_2} = Sauerstoff - Konstante des Gefäßes ohne
Absorption

k_{CO_2} = CO_2 - Konstante des Gefäßes ohne Absorption

Bei diesen Parallelbestimmungen ergeben sich Ungenauigkeiten dadurch, daß das Gewebe einmal in CO_2 - freiem, das anderemal in CO_2 - haltigem Milieu atmet, wodurch nach Dixon(3) der O_2 - Verbrauch in beiden Gefäßen verschieden sein kann. Dieser Mangel beeinträchtigt hauptsächlich die Bestimmung der Menge des gebildeten CO_2 , da diese indirekt aus dem O_2 - Verbrauch errechnet wird. Weiterhin wird die Messung der CO_2 - Bildung dadurch ungenau, daß ein Teil des gebildeten CO_2 in der verwendeten Phosphatpufferlösung retiniert wird.

Die mit dieser Methode ermittelten Größen lassen daher nur eine vergleichende Beurteilung der CO_2 - Bildung hinsichtlich einer Vermehrung oder Verminderung gegenüber Vergleichsversuchen zu.

Die während der Versuche durch geringe Änderungen der Temperatur des Wasserbades und Änderungen des äußeren Luftdrucks hervorgerufenen Manometerschwankungen werden durch ein bei jedem Versuchsansatz mitgeführtes Thermobarometer (Warburg-Manometer, dessen Reaktionsgefäß die entsprechende Menge destillierten Wassers^{+) enthält) registriert und bei der Berechnung berücksichtigt.}

^{+) Im Vergleichsversuch ergeben sich keine Unterschiede zwischen der verwendeten Pufferlösung und destilliertem Wasser.}

2. Herstellung des Leberhomogenates.

Das Versuchstier (weiße Maus) wird getötet und durch Aufschneiden der Halsgefäße entblutet. Die Leber wird herauspräpariert und im Gewichtsverhältnis 1:10 in eine Pufferlösung der aus Tabelle 1 hervorgehenden Zusammensetzung gebracht.

Tabelle 1

Zusammensetzung der Pufferlösung.

Laevulose puriss. 2,0

Sörensen-Phosphat-

Puffer, pH 7,4 ad 1000,0

Sörensen-Phosphat-Puffer, pH 7,4:

Lösung A: 1/15 m KH_2PO_4

Lösung B: 1/15 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

808 ml Lösung B + 192 ml Lösung A

Diese Pufferlösung wird nach Dixon (3) auch ohne Zusatz der in der Ringerlösung enthaltenen Salze für Bestimmungen der Atmungsgrößen an tierischen Geweben als geeignet empfohlen.

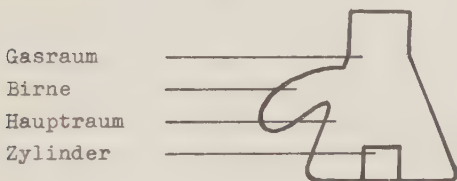
Die Leber wird mit der Pufferlösung im Homogenisator nach Potter und Elvehjem (4)^{*)} bei einer Drehzahl von 2000 U/min zwei Minuten homogenisiert. Von 1 ml des Homogenates wird nach Kjehldahl der Stickstoffgehalt bestimmt.

^{*)} Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, den Glasstempel des Homogenisators durch einen solchen aus Plexiglas zu ersetzen, um die Absplitterung von Glaspartikeln zu verhindern. Ferner werden Homogenisiergefäße mit flachem Boden verwendet, um die vollständige Zermahlung des Materials zwischen Gefäßboden und Stempel zu gewährleisten. In die Grundfläche des Stempels ist eine Spirale eingeschliffen, die das Material an die Seitenwand des Gefäßes schleudert.

3. Füllung der Warburg-Reaktionsgefäße.

Zur Verwendung gelangen Warburg-Reaktionsgefäße vom in Abbildung 1 gezeigten Typ, mit einem Volumen von ca. 15 ml.

Abbildung 1



Sie werden wie folgt beschickt:

Der Hauptraum enthält 1,1 ml Leberhomogenat.

Der darüber gelegene Gasraum enthält Luft.

Die Birne enthält 0,5 ml Pufferlösung, in der der zu untersuchende Zusatz in der 3,2 fachen Konzentration gelöst ist. (Durch Einkippen in den Hauptraum bei Versuchsbeginn wird der Birneninhalt im Verhältnis 1 : 3,2 verdünnt.) Bei den zugehörigen Leerversuchen entfällt dieser Zusatz.

Der Zylinder am Boden des Reaktionsgefäßes enthält:

- a) bei den Versuchen zur Bestimmung des O_2 - Verbrauches 0,4 ml 20%ige Kalilauge zur CO_2 - Absorption und zur Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche ein Röllchen aus Filterpapier (18 . 40 mm).
- b) bei den Versuchen zur Bestimmung der CO_2 - Bildung enthält der Zylinder 0,4 ml Aqua dest.

Das Gesamtflüssigkeitsvolumen im Reaktionsgefäß beträgt somit 2,0 ml.⁺)

⁺) Es bleibt also bei dem Gefäßvolumen von 15 000 cmm ein Gasraum von 13 000 cmm, dessen O_2 - Partialdruck bei dem geringen O_2 - Verbrauch der Homogenate nur wenig absinkt.

4. Beschickung des Thermostaten und Versuchsverlauf.

Die Reaktionsgefäße werden an die zugehörigen Manometer angeschlossen und in das Wasserbad des Warburg - Thermostaten gebracht.

Nach 15 min Temperaturlausgleichszeit beginnt der Versuch mit dem Einkippen des Zusatzes zum Homogenat in den Hauptraum des Reaktionsgefäßes.

Während des Versuches werden die Reaktionsgefäße mit einer Frequenz von 120/min und einer Amplitude von 2,5 cm geschüttelt.

Die Versuchstemperatur beträgt 37°C.

Die Manometer werden jeweils nach 15 min abgelesen. Die letzte Ablesung erfolgt 60 min nach Versuchsbeginn.

5. Auswertung der Versuchsergebnisse.

Nach den Formeln 1 und 2 wird aus dem abgelesenen Manometerausschlag der O₂- Verbrauch bzw. die CO₂ - Produktion pro K6lbchen errechnet. Daraus wird mit Hilfe des Stickstoffgehaltes die O₂- Aufnahme bzw. CO₂ - Produktion pro mg N bestimmt.

Die aus den Versuchsergebnissen errechneten Mittelwerte werden hinsichtlich der Signifikanz ihrer Differenz mit Hilfe des t - Vergleiches (Abweichung vom Mittelwert) statistisch nachgepr6uft.(5) +)

+) Auf nicht signifikante Unterschiede wird bei den betreffenden Tabellen der Arbeit hingewiesen.

III. E R G E B N I S S E .

理 論 與 實 踐

A. Die Leeratmung der Mäuseleberhomogenate.

Der Sauerstoffnormverbrauch und seine Schwankungen.

In Tabelle 2 sind die Einzelwerte für die Atmung der Leberhomogenate aus 115 Versuchen an 32 Homogenaten wiedergegeben.

Tabelle 2

Einzelwerte der O_2 - Aufnahme in cmm/mg N

Homogenat Nr.	Zeit			
	15 min	30 min	45 min	60 min
1	11,6	24,1	28,1	33,3
	12,9	25,7	28,9	33,7
	13,3	24,9	28,9	33,3
2	10,3	14,1	17,5	20,1
	10,3	15,4	19,7	24,4
	9,8	16,2	20,9	25,6
3	12,3	19,2	24,1	27,8
	13,1	20,0	24,5	29,8

Tabelle 2 Forts.

Homogenat Nr.	Zeit			
	15 min	30 min	45 min	60 min
4	14,7	20,8	25,7	29,4
	13,5	21,2	25,7	30,6
	8,6	17,2	22,5	26,8
	11,5	20,1	26,3	30,6
	9,6	18,7	24,7	28,7
	9,6	18,7	24,4	27,8
5	10,2	16,6	21,4	24,6
	10,7	19,3	24,1	27,8
	10,2	17,7	22,5	26,7
	9,1	16,7	22,5	26,7
6	11,1	22,9	28,2	32,2
	12,3	23,5	30,5	33,4
	11,1	21,7	27,0	30,5
	11,7	22,3	28,7	32,3
7	13,0	25,5	30,4	33,2
	13,0	25,5	30,4	35,3
	12,5	25,0	29,3	34,2
8	9,1	18,3	26,8	32,7
	9,1	19,0	26,8	32,0
	7,8	18,6	24,8	31,4
	7,2	17,6	25,5	32,0
9	6,6	15,1	22,4	27,6
	5,9	15,1	24,3	30,3
	7,2	17,1	27,0	32,2
	5,0	14,5	25,7	31,6
10	4,0	12,6	18,5	27,8
	6,0	17,2	23,8	33,0
	3,3	12,6	21,8	29,8
	4,0	14,6	18,5	27,8
11	6,4	14,7	23,4	29,4
	6,0	15,1	25,2	32,1
	4,6	13,8	23,9	29,8
	7,3	14,7	24,3	32,1
12	6,0	14,2	21,9	26,2
	6,4	15,5	23,2	27,5
	4,7	13,3	21,0	24,9
	4,3	12,9	20,6	25,3
13	6,9	17,1	22,4	25,2
	8,1	17,5	22,8	26,4
	7,3	15,9	21,5	24,4
	8,1	15,9	22,0	25,2

Tabelle 2 Forts.

Homogenat Nr.	Zeit			
	15 min	30 min	45 min	60 min
14	13,6	21,6	26,3	29,7
	13,2	20,9	25,6	28,9
	12,8	20,1	24,5	27,8
	11,7	19,4	24,2	27,8
15	10,8	16,9	23,1	26,5
	10,8	16,2	23,1	27,7
	10,4	15,8	21,9	24,6
16	13,3	23,3	29,6	33,7
	13,3	23,7	30,4	34,4
	12,6	23,7	28,9	33,7
17	10,6	18,8	23,4	27,0
	12,1	19,9	23,8	28,5
	9,4	18,0	21,9	25,4
	12,1	21,1	25,0	29,3
18	12,0	20,4	25,0	30,1
	12,5	21,3	25,9	31,5
	11,6	20,8	25,9	30,6
	12,0	20,4	25,0	30,1
19	10,4	20,4	24,8	28,7
	10,4	21,7	26,1	30,0
	8,7	18,7	23,0	24,7
	9,1	18,7	23,9	27,8
20	9,1	17,7	20,3	26,3
	9,5	16,4	19,8	25,4
	8,6	15,9	20,7	25,0
	6,3	12,9	22,5	28,8
21	6,6	14,4	24,4	29,5
	5,2	11,8	21,4	26,9
	5,6	16,2	25,9	30,6
22	6,5	14,4	23,6	27,3
	6,5	16,7	23,2	27,3
	5,6	14,4	22,7	26,9
23	8,6	14,3	17,9	20,4
	7,1	12,5	16,4	19,3
	7,1	12,5	16,8	19,6
24	7,1	14,1	19,6	23,5
	6,7	12,2	18,4	22,4
	4,7	10,6	17,3	20,3
25	5,4	12,7	16,7	21,1
	5,4	12,7	16,7	29,6

Tabelle 2 Forts.

Homogenat Nr.	Zeit			
	15 min	30 min	45 min	60 min
26	5,9	13,2	18,6	23,0
	5,9	12,7	18,1	22,1
	12,8	19,2	22,8	26,8
	13,6	19,6	22,4	26,0
	12,4	18,8	22,0	24,8
27	7,8	14,7	19,1	24,0
	8,8	15,6	19,6	24,5
	7,4	13,2	18,6	22,1
	7,8	14,2	19,6	23,5
28	5,5	11,9	18,7	24,7
	5,9	13,2	19,2	25,6
	5,9	11,9	18,3	24,2
	5,9	13,7	20,6	26,0
29	3,0	7,8	13,2	15,5
	3,0	7,8	12,8	15,9
	2,0	7,1	10,5	12,8
	2,0	7,8	11,8	14,9
30	3,8	9,3	14,4	18,3
	5,4	11,2	18,3	22,8
	5,1	10,3	16,0	19,6
31	6,8	13,2	17,5	21,1
	8,6	15,4	19,6	22,5
	7,9	15,0	18,9	22,5
32	10,7	19,8	26,4	29,5
	10,7	19,0	25,2	28,5
	11,2	20,7	27,3	33,5

Die Tabelle 3 zeigt die aus den Einzelwerten errechneten Mittelwerte der Atmung für die Zeit von 15 bis 60 min nach Versuchsbeginn, sowie die aus den Einzelwerten errechnete Streuung.

Tabelle 3

Mittelwerte des O_2 - Verbrauches, errechnet aus den Werten der Tabelle 2.

$t_{\min}$	mittl. O_2 -Verbr. in cmm/mg N	Gesamtstreuung aller 115 Ver- suche in % d.MW	Mittlere Streuung innerhalb eines Versuchsansatzes
15	8,7	$\pm 35,48 \%$	-
30	16,8	$\pm 26,30 \%$	-
45	22,6	$\pm 18,23 \%$	-
60	27,1	$\pm 16,80 \%$	$\pm 4,9$

Aus Tabelle 3 ergibt sich die mittlere O_2 - Aufnahme der Homogenate zu 27,1 cmm / mg N und Stunde.

Diese Größe bleibt hinter dem O_2 - Verbrauch von Leberschnitten zurück, eine Erscheinung, die nach Cremer und Führ (6) auf die Homogenisierung und die damit verbundene teilweise Zerstörung von Fermenten zurückzuführen ist.

Die Versuchsstreuung ist, wie ebenfalls aus Tabelle 3 hervorgeht, innerhalb des einzelnen Versuchsansatzes gering. Sie beträgt $\pm 4,9 \%$ des Mittelwertes und bewegt sich damit innerhalb der von Dixon (3) angegebenen Grenzen.

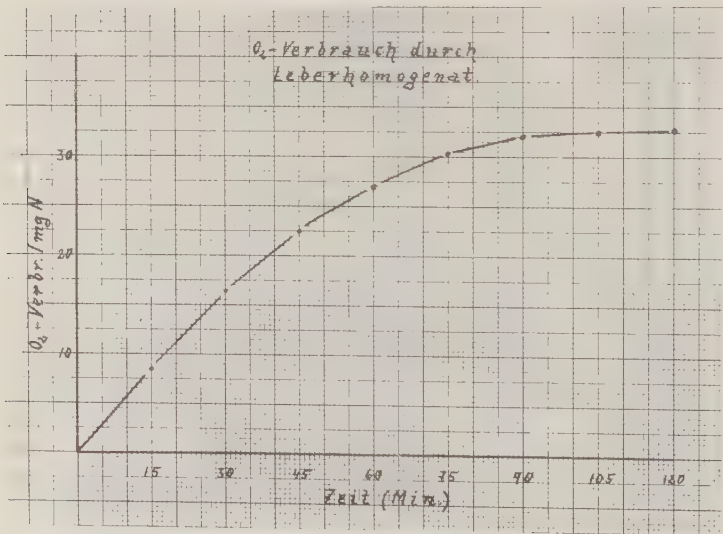
Demgegenüber hat sich die Gesamtstreuung, das heißt die Streuung von Leber zu Leber als erheblich größer erwiesen (siehe ebfd. Tab.3), sodaß ein direkter Vergleich der Versuchsansätze untereinander wesentlich schwieriger ist, als der Vergleich der Einzelversuche innerhalb eines Versuchsansatzes.

Beispielsweise ist die Streuung der 60-Minuten-Werte von Leber zu Leber angenähert das Vierfache der Streuung innerhalb eines Versuchsansatzes, nämlich 16,8 % des Mittelwertes.

Zeitlicher Verlauf und optimaler Zeitabschnitt der O_2 - Aufnahme.

In Abbildung 2 ist der zeitliche Verlauf der O_2 - Aufnahme in den ersten 60 Minuten nach Versuchsbeginn graphisch dargestellt.

Abbildung 2



Die Kurve zeigt im wesentlichen einen logarithmischen Verlauf, wobei die stationäre Phase - wie Vorversuche ergeben haben - nach etwa 2 Stunden erreicht sein dürfte.

Die CO_2 - Bildung der Homogenate und ihre Schwankungen.

In weiteren Versuchen an 10 verschiedenen Homogenaten wurden gleichzeitig der O_2 - Verbrauch und die CO_2 - Produktion gemessen.

Die Einzelwerte der 30 O_2 - und 20 CO_2 - Bestimmungen sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4

Gleichzeitige Bestimmung des O_2 - Verbrauches und der CO_2 - Produktion pro mg N und Stunde an 10 Homogenaten.

Homogenat Nr.	cmm O_2 /mg N und Stunde	cmm CO_2 /mg N und Stunde
1	26,3	11,1
	28,7	9,5
	27,4	
2	23,5	11,6
	26,2	9,8
	27,7	
3	22,3	5,0
	21,6	5,7
	22,3	
4	18,6	4,1
	20,4	6,3
	24,9	
5	19,6	6,0
	22,9	3,8
	23,4	
6	23,6	13,0
	23,9	15,9
	26,9	
7	21,3	7,3
	21,3	6,8
	21,3	
8	24,8	7,7
	25,1	7,7
	24,4	
9	22,0	4,7
	22,0	4,1
	24,0	
10	24,5	7,7
	24,5	9,8
	25,5	

Aus der Tabelle 4 ergibt sich eine mittlere CO_2 -Produktion der Leberhomogenate von:

7,7 cmm / mg N und Stunde.

Die mittlere Streuung der CO_2 -Produktionswerte ist, wie die Tabelle weiterhin zeigt, beträchtlich. Sie beträgt, bezogen auf den Mittelwert gleich 100, $\pm 44\%$. Dies beruht auf den bereits eingangs im Abschnitt "Methodik, 1" erwähnten Mängeln der CO_2 -Bestimmung nach der direkten Warburg Methode. Wegen der hohen Streuung und der niedrigen Absolutwerte der CO_2 -Produktion wurde auf die Beobachtung des zeitlichen Verlaufes der CO_2 -Produktion verzichtet.

Der Respiratorische Quotient (RQ) der Homogenate und seine Schwankungen.

Die Tabelle 5 zeigt die aus Tabelle 4 errechneten Respiratorischen Quotienten der untersuchten Leberhomogenate.

Tabelle 5

Vers.Nr.	RQ	Vers.Nr.	RQ
1	0,42	6	0,67
	0,33		0,55
2	0,49	7	0,34
	0,37		0,32
3	0,22	8	0,31
	0,26		0,31
4	0,22	9	0,21
	0,31		0,19
5	0,31	10	0,31
	0,17		0,40

Aus Tabelle 5 ergibt sich der durchschnittliche RQ der Homogenate zu

0,33

Seine mittlere Streuung (in % des Mittelwertes) beträgt $\pm 39\%$

B. Atmung der Leberhomogenate unter Amidopyrin.

Der Abschnitt B der Ergebnisse stellt die Versuchsreihen dar, die mit Leberhomogenat unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von Amidopyrin angestellt wurden.

Der Sauerstoffverbrauch der Leberhomogenate unter Amidopyrin.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über den O_2 - Verbrauch der Leberhomogenate unter Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen von Amidopyrin sind in den Tabellen 6 - 10 wiedergegeben.

Tabelle 6

Sauerstoffverbrauch der Homogenate unter Zusatz von Amidopyrin in einer Konzentration von 12,5 mg % verglichen mit Leerversuchen.

Sauerstoffverbrauch in cmm /h und mg N

des Homogenates ohne Amidopyrin	des gleichen Homogenates mit 12,5 mg % Amidopyrin
19,6	20,1
22,9	20,7
23,4	21,1
20,1	21,8
24,4	21,4
25,6	23,9
Mittelw: 22,7	21,5

Differenz der Mittelwerte in % des Leerwertes: 5,3 %
(Der Wert ist nicht signifikant und somit gleich 0 zu setzen.)

Tabelle 7

Sauerstoffverbrauch der Homogenate unter Zusatz von
Amidopyrin in einer Konzentration von 16,0 mg %
verglichen mit Leerversuchen.

Sauerstoffverbrauch in cmm / h und mg N

des Homogenates ohne Amidopyrin	des gleichen Homogenates mit 16,0 mg % Amidopyrin
27,8	24,9
29,8	26,9
29,4	26,1
30,6	28,2
26,8	25,4
30,6	22,5
28,7	22,5
27,8	21,1
24,6	23,0
27,8	21,9
26,7	23,0
26,7	22,5
18,6	20,4
20,4	18,9
24,9	20,8
22,0	17,9
22,0	17,9
Mittelw: 26,2	22,6

Differenz der Mittelwerte in % des Leerwertes : 13,8 %

Tabelle 8

Sauerstoffverbrauch der Homogenate unter Zusatz von
Amidopyrin in einer Konzentration von 23,0 mg %
verglichen mit Leerversuchen.

Sauerstoffverbrauch in cmm / h und mg N

des Homogenates ohne Amidopyrin	des gleichen Homogenates mit 23,0 mg % Amidopyrin
22,3	18,0
21,6	17,0
22,3	18,8
24,8	19,0
25,1	17,8
24,4	20,9
32,3	22,3
33,4	22,3
30,5	22,9
32,3	23,5
33,2	25,0
35,3	23,9
34,2	24,5
33,7	25,5
32,7	24,2
32,0	24,8
31,4	25,5
32,0	25,5
27,6	21,7
30,3	20,3
31,6	21,1
Mittelw: 29,7	22,1

Differenz der Mittelwerte in % des Leerwertes : 25,6 %

Tabelle 9

Sauerstoffverbrauch der Homogenate unter Zusatz von
Amidopyrin in einer Konzentration von 31,0 mg %
verglichen mit Leerversuchen.

Sauerstoffverbrauch in cmm / h und mg N

des Homogenates ohne Amidopyrin	des gleichen Homogenates mit 31,0 mg % Amidopyrin
27,8	23,8
33,0	21,2
29,8	22,5
27,8	22,5
30,1	22,2
31,5	20,4
30,6	20,4
30,1	20,4
26,2	19,1
27,7	21,2
21,3	17,8
21,3	16,2
21,3	16,5
Mittelw: 27,6	20,3

Differenz der Mittelwerte in % des Leerwertes : 26,4 %

Tabelle 10

Sauerstoffverbrauch der Homogenate unter Zusatz von
Amidopyrin in einer Konzentration von 50,0 mg %
verglichen mit Leerversuchen.

Sauerstoffverbrauch in cmm / h und mg N

des H omogenates ohne Amidopyrin	des gleichen Homogenates mit 50,0 mg % Amidopyrin
26,3	22,1
28,7	22,4
27,4	22,6
23,6	17,7
26,9	18,6
33,3	24,5
33,7	24,9
33,3	23,7
27,0	18,4
28,5	20,7
25,4	21,1
29,3	19,1
Mittelw: 28,6	21,2

Differenz der Mittelwerte in % des Leerwertes : 25,6 %

Die Tabelle 11 gibt einen Überblick über die in den Tabellen 6 - 10 ermittelten Unterschiede im Sauerstoffverbrauch der Leberhomogenate unter Zusatz der verschiedenen Amidopyrinkonzentrationen gegenüber den zugehörigen Leerversuchen.

Tabelle 11

Amidopyrin-Konzentration	Unterschied im O ₂ -Verbr. gegenüber dem Leerversuch (in % des Leerversuches)
12,5 mg %	5,6 % (nicht signifikant, also 0)
16,0 mg %	13,8 %
23,0 mg %	25,6 %
31,0 mg %	26,4 %
50,0 mg %	25,6 %

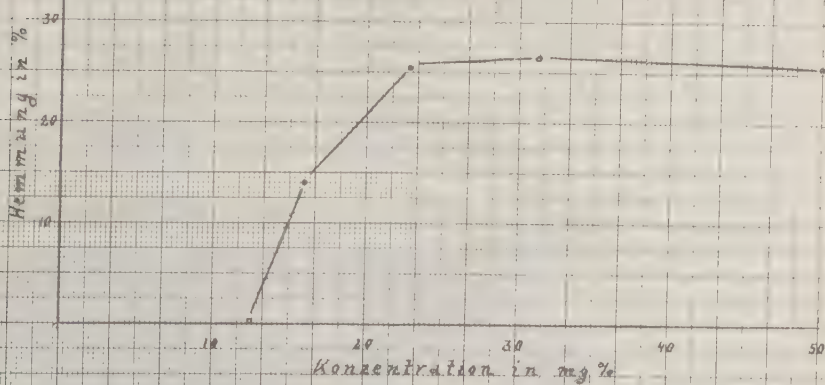
Die in Tabelle 11 wiedergegebenen Unterschiedswerte zeigen, daß die Minderung des Sauerstoffverbrauches der Leberhomogenate durch Zusatz von Amidopyrin im Konzentrationsbereich zwischen 12,5 mg % und 23,0 mg % konzentrationsabhängig ist.

Konzentrationen unter 16,0 mg % zeigen keine deutliche Hemmwirkung mehr. Durch Konzentrationen über 23,0 mg % läßt sich eine deutliche Steigerung der Hemmung nicht mehr erreichen.

Die Abbildung 3 (Seite 23) verdeutlicht das Zahlenmaterial der Tabelle 11 graphisch. Sie zeigt die bei einer Konzentration von 12,5 mg % und bei einer Konzentration von 23,0 mg % gelegenen Wendepunkte der Kurve.

Abbildung 3

Hemmung d. O₂-Verbrauches
d. Amidopyrin



Die CO₂- Bildung der Leberhomogenate unter Amidopyrin.

Die Ergebnisse der Messungen der CO₂- Produktion der Homogenate unter Zusatz von Amidopyrin, verglichen mit den zugehörigen Leerwerten, sind in der Tabelle 12 wiedergegeben.

Tabelle 12

CO₂- Produktion in cmm / h und mg N

Homogenat Nr.	Amidopyrin- Konzentration	CO ₂ -Produkt. i. Leerversuch	CO ₂ -Produkt. unter Amidopyrin
1	12,5 mg %	6,0 3,8	6,0 6,0 7,1
2	12,5 mg %	9,8 7,7	4,6 5,2 3,2
3	16,0 mg %	6,3 4,1	6,6 8,8 9,1
4	16,0 mg %	4,7 4,1	4,4 5,1 4,8
5	23,0 mg %	5,7 5,0	6,4 7,1 7,4
6	23,0 mg %	7,7 7,7	6,6 7,0 8,5
7	31,0 mg %	11,6 9,8	8,1 7,5 8,3
8	31,0 mg %	7,3 3,8	6,4 6,7 8,9
9	50,0 mg %	11,1 9,5	11,3 12,1 11,1
10	50,0 mg %	15,9 13,0	9,7 9,4 8,9

Wie aus Tabelle 12 hervorgeht, sind die Unterschiede in der CO_2 -Produktion der Leberhomogenate unter Einwirkung von Amidopyrin gegenüber der CO_2 -Bildung der Homogenate ohne Zusatz in keinem Falle signifikant und hinsichtlich ihres Vorzeichens inkonstant. Trotz der bereits angegebenen Mängel in der Methode der CO_2 -Bestimmung erscheint jedoch die Aussage gerechtfertigt, daß durch Amidopyrin eine schwerwiegende Beeinflussung der CO_2 -Produktion nicht bewirkt wird.

Es bliebe einer weiteren Untersuchung, bei der eine für die CO_2 -Bestimmung geeignetere Methode zur Anwendung gelangt, vorbehalten, festzustellen, ob das Amidopyrin auf die CO_2 -Bildung der Homogenate einen Einfluß ausübt, der mit der hier angewandten Methode nicht mehr erfaßt werden kann.

Der Respiratorische Quotient der Leberhomogenate unter Einwirkung von Amidopyrin.

Die oben erwähnten Schwierigkeiten in der Bestimmung der CO_2 -Produktion der Homogenate lassen von vornherein keine befriedigenden Ergebnisse bei Untersuchungen des respiratorischen Quotienten der Homogenate unter dem Einfluß von Amidopyrin erwarten.

Da jedoch eine grob vergleichende Beurteilung der Ergebnisse der Untersuchungen über den RQ möglich ist, seien die errechneten Werte in Tabelle 13 wiedergegeben.

Der RQ unter Amidopyrinzusatz wurde nur unter den Amidopyrinkonzentrationen untersucht, die auf Grund der Hemmung des O_2 -Verbrauches auch eine Beeinflussung des RQ erwarten lassen.

Tabelle 13

Der respiratorische Quotient der Leberhomogenate unter
Einwirkung von Amidopyrin verglichen mit den zugehörigen
Leerwerten.

Amidopyrin- Konzentration	RQ im Leerversuch	RQ unter AP-Zusatz
50 mg %	0,38	0,52
	0,50	0,58
31 mg %	0,38	0,42
	0,27	0,43
23 mg %	0,24	0,39
	0,31	0,38
16 mg %	0,25	0,41
	0,19	0,26

Bei den durchgeführten 8 Bestimmungen zeigt sich
eine Erhöhung des respiratorischen Quotienten unter
Einwirkung von Amidopyrin. Eine Konzentrationsabhängig-
keit ist jedoch auf Grund der Streuung der Ergebnisse
nicht feststellbar.

C. Der Sauerstoffverbrauch von Leberhomogenaten
unter Einwirkung von Amidopyrin und ATP.

Aus 12 Versuchen an 4 Homogenaten ergab sich, daß der Sauerstoffverbrauch der unter der Einwirkung von 50 mg % Amidopyrin stehenden Leberhomogenate durch Zusatz von Adenosintriphosphorsäure in einer Konzentration von 20 mg % gesteigert werden kann.

Die Einzelversuche sind in Tabelle 14 angeführt.

Tabelle 14

Sauerstoffverbrauch in cmm / h und mg N

des Homogenates mit 50 mg % Amidopyrin		des gleichen Homogenates mit 50 mg% Amidopyrin + 20 mg% ATP		Differenz in % d. Leerwertes (+)
10,6		14,5		
10,6	MW: 10,6	12,5	MW: 13,8	30,2 %
10,6		14,5		(t = 4,7)
16,3		22,3		
16,9	MW: 17,2	22,6	MW: 22,6	31,4 %
18,4		22,9		(t = 8,3)
24,7		25,9		
21,3	MW: 23,1	29,3	MW: 27,3	18,2 %
23,4		26,8		(t = 2,96)
27,1		30,5		
25,6	MW: 26,1	29,8	MW: 29,5	13,0 %
25,6		28,2		(t = 3,75)

+) Wegen der geringen Anzahl der Versuche werden hier
die t - Werte angegeben.

IV. DISKUSSION.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Versuchsergebnisse

1. eine von der Amidopyrinkonzentration abhängige Hemmung des Sauerstoffverbrauches der Leberhomogenate, die zu einer maximalen Minderung der O_2 - Aufnahme um 25 % führt und durch weiteren Amidopyrinzusatz nicht mehr gesteigert werden kann,

2. eine Steigerung der durch Amidopyrinzusatz gehemmten Atmung durch Zugabe von Adenosintriphosphorsäure

führen zu folgenden Erwägungen:

Die Versuche über die normale Atmung der Leberhomogenate zeigen, daß die im Homogenat ablaufenden Stoffwechselprozesse vorwiegend aerob sind. Auch ein Angebot von Zucker in physiologischen Dosen scheint diese Stoffwechsellage der Leber mit ihrem niedrigen respiratorischen Quotienten nicht zu beeinflussen. Die Vermutung, daß es sich bei der durch Amidopyrin bewirkten Verminderung des Sauerstoffverbrauches um eine grobtoxische Schädigung der Leberzelle, etwa im Sinne einer eingreifenden chemischen oder physikalischen Veränderung

handelt, wird dadurch, daß sich selbst durch stärkste Erhöhung der Amidopyrinkonzentration eine vollständige Aufhebung der Atmung nicht erreichen läßt, widerlegt. Ebenso wäre eine derartige Erklärung der Hemmung der Atmung durch die Tatsache, daß die CO_2 -Produktion des Homogenates unter Amidopyrin keine signifikante Änderung zeigt, nicht befriedigend.

Die Suche nach dem Angriffspunkt des Pyrazolonkörpers wird durch derartige Überlegungen vielmehr auf das Geschehen im Inneren der Zelle gelenkt, wobei insbesondere an eine Hemmung von Fermentaktivitäten(?) gedacht werden muß. Die Frage, in welcher Richtung eine Beeinflussung der Enzymreaktionen zu suchen wäre, ist auf Grund der vorliegenden Untersuchungen allein nicht zu beantworten, da die Sauerstoffaufnahme der Homogenate letzten Endes die Folge der gesamten, sich in der Leber abspielenden Stoffwechselprozesse ist, die allein als Eiweiß-, Fett-, und Kohlehydratabbau eine Vielzahl von Fermentreaktionen einschließen. Genauere Aufschlüsse über den Ort der Hemmung könnten daher nur Untersuchungen einzelner Enzymreaktionen geben.

Eine Reihe von Versuchsergebnissen in dieser Richtung lassen jedoch die Vermutung, daß es sich bei der vorliegenden Hemmung um eine Beeinflussung des aeroben Kohlehydratabbaues handelt, berechtigt erscheinen.

So kann gezeigt werden, daß die Atmung von Hefesuspensionen⁺⁾ durch Amidopyrin ebenfalls gehemmt wird. Durch Zusatz von Cocarboxylase zur Hefesuspension wiederum kann eine Steigerung der durch Amidopyrin verminderten

⁺⁾ Die mit Hefezellsuspensionen angestellten Versuchsreihen werden, da sie mit der Fragestellung der Arbeit nicht in direktem Zusammenhang stehen, im Anhang wiedergegeben.

Atmung erreicht werden. Zugabe von ATP zum Leberhomogenat zeigt eine die Hemmung aufhebende Beeinflussung des O_2 -Verbrauches. Frühere Untersuchungen(1,2) fanden eine Verzögerung des Fruktoseabbaues und eine mangelnde Oxydation von DPN- H_2 durch das mit Pyrazolonkörpern versetzte Leberhomogenat, während es andererseits gelang, diese Effekte durch Cocarboxylase- und Vitamin B_{12} -Zusatz zum Homogenat aufzuheben. Obwohl diese Ergebnisse den Ort der Hemmwirkung des Amidopyrin im Kohlehydratstoffwechsel suchen ließen, scheint eine derartige Annahme der ebenfalls gefundenen Erhöhung des respiratorischen Quotienten zu widersprechen.

Die Tatsache, daß die Oxydation des DPN- H_2 herabgemindert wird, läßt allerdings auch wahrscheinlich erscheinen, daß das Amidopyrin seine Wirkung an Fermenten entfaltet, die die DPN-Regeneration bewirken, also etwa in der Kette der Dehydrogenasen, Cytochrome, die allerdings schon ein Sammelbecken für die sauerstoffverbrauchenden Prozesse aus dem gesamten Stoffwechsel darstellen.

Legt man den anzustellenden Überlegungen daher die Möglichkeit zu Grunde, daß es sich bei der Hemmung durch Pyrazolone etwa um eine Inaktivierung dieser Wasserstoffübertragenden Fermente handelt, so läge bei der erwähnten stark aeroben Stoffwechsellaage der Leber die Vermutung nahe, daß nunmehr der Energiebedarf der Zelle durch Stoffwechselprozesse gedeckt werden müßte, die in höherem Maße anaerob ablaufen. Hier wäre natürlich in erster Linie an den Kohlehydratstoffwechsel zu denken. Da es jedoch kaum wahrscheinlich ist, daß die Leberzelle zu einem anaeroben Abbau der Kohlehydrate in bedeutendem Ausmaße befähigt ist, muß sich eine Hemmung dieser Fermente schließlich auch in hohem Maße auf den Kohlehydratstoffwechsel auswirken und sich dann vor allem in einer Verminderung der energiereichen Phosphate äußern, für deren Bildung ein ungestört ablaufender aerober Stoff-

wechsel die Voraussetzung ist.(8) Bekräftigt wird diese Annahme durch die Erhöhung des O_2 - Verbrauches der gehemmten Homogenate bei ATP - Zugabe. •

Eine Analyse des Hemmungstyps(9) - kompetitive oder nicht kompetitive Hemmung - könnte erst nach Auf- findung der tatsächlich gehemmten Enzyme durchgeführt werden.

Die vorliegende Arbeit kann somit aufzeigen, daß die in früheren Veröffentlichungen(1,2) gefundene Hem- mung des Kohlehydratstoffwechsels durch Pyrazolone bei der Leber tatsächlich auch in einer Verminderung des gesamten oxydativen Stoffwechsels zum Ausdruck kommt, demnach also die Möglichkeit einer Kompensation des verminderten Energiegewinnes durch Abbau anderer Sub- stanzen nicht gegeben ist.

Auf der Suche nach dem Ort der Hemmung muß sie sich jedoch darauf beschränken, einige Möglichkeiten aufge- zeigt zu haben.

Es bleibt daher einer weiteren Reihe von Untersu- chungen vorbehalten den genauen Angriffsort des Amido- pyrin im Leberstoffwechsel festzustellen, wobei die Einwirkung dieser Substanz vor allem auf enzymatische Einzelreaktionen geprüft werden müßte.

V. A N H A N G .

■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■

Die nachfolgend aufgeführten Versuchsreihen sollen zeigen, daß die an der Leber erhobenen Befunde (Hemmung des Sauerstoffverbrauches durch Amidopyrin und die Aufhebung dieser Hemmung durch Cocarboxylase) sich auch an Hefezellen reproduzieren lassen, also an Zellen, die in ihrem Stoffwechselgeschehen ganz auf Kohlehydratabbau eingestellt sind. Diese Tatsache kann bei der Suche nach dem Orte der Hemmwirkung des Amidopyrin richtungsweisend sein.

Die Bestimmung der Atmungsgrößen der Hefezellen erfolgte ebenfalls nach der direkten Warburg-Methode. Dazu wurden die Zellen im Gewichtsverhältnis 1 : 200 in Sörensen-Phosphatpuffer mit 625 mg % Fruktose suspendiert.

Die verbrauchten Gasmengen sind in den Tabellen in cmm pro ml Hefesuspension angegeben. Da es sich bei den Versuchen nur um Vergleiche von Leerversuchen gegenüber Versuchen unter Zusatz von Amidopyrin handelt, wurde auf eine genauere Standardisierung der Sauerstoffverbrauchswerte (Bezug auf 1 mg N) verzichtet.

Tabelle 1

O₂- Verbrauch in cmm / h und ml Zellsuspension.

Leerversuch	Vers.m.Amido- pyrin	Amidopyr. Konzentr.	Hemmung
159	143		
157	142		
157 MW: 157	140 MW: 142	150 mg %	9,5 %
153	141		
175	138		
171	149		
172 MW: 173	148 MW: 144	200 mg %	17,0 %
172	148		
136	118		
140	112		
135 MW: 136	105 MW: 110	250 mg %	19,2 %
134	105		

Die Tabelle 2 zeigt die Einwirkung von Cocarboxylase auf die Atmung der unter Amidopyrin stehenden Hefezellen.

Tabelle 2

O₂- Verbrauch in cmm / h und ml Zellsuspension.

Leerversuch	Vers.m. Amido- pyrin 250 mg %	Vers.m.Cocarboxylase 23 mg% + 250 mg% AP
174	129	144
167	134	145
165 MW: 167	133 MW: 132	143 MW: 145
162	131	146
	Hemmg.geg.Leerw. 21,0 %	Hemmg.geg.Leerw. 15,2 %

Aus den Tabellen 1 und 2 ergibt sich eine konzentrations-abhängige Hemmung des Sauerstoffverbrauches von Hefezellen durch Amidopyrin und eine teilweise Aufhebung der Hemmung durch Cocarboxylase.

Literaturverzeichnis.

- 1) HAMMERSCHMIDT, O., Über die Beeinflussung des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels von Leberhomogenat durch Pyrazolone, Diss. Univ. Erlangen 1955
- 2) KÜGLE, R., Über die Wirkung von Cocarboxylase, Aneurin, Vitamin B₁₂ und Pantothensäure auf den durch Pyrazolone gehemmten Kohlenhydratstoffwechsel von Leberhomogenat, Diss. Univ. Erlangen 1955
- 3) DIXON, M., Manometric Methods, Cambridge Univ. press 1951
- 4) POTTER, V. J. u. ELVEHJEM, Journal of biological Chemistry 1936/114, 495
- 5) CNEDECOR, G. W., Statistical Methods, The Iowa State College Press 1950
- 6) CREMER, H. D. u. FÜHR, J., zitiert nach Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch d. physiolog. u. patholog. chemischen Analyse 1953/5
- 7) MASSART, L., Sumner-Myrbäck, I/1, 307, zitiert nach Flaschenträger-Lenartz, Handbuch d. physiolog. Chemie I
- 8) HOLZER, H., Über Fermentketten, 4. Colloquium d. Gesellschaft f. physiolog. Chemie 1953
- 9) MICHAELIS, L. u. MEUTEN, M. L. zitiert nach Flaschenträger-Lehnartz, Handbuch d. physiolog. Chemie I

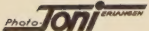
Es ist mir eine angenehme Pflicht ,
Herrn Professor Dr. J a h n , Direktor der
I. med. Klinik der städtischen Krankenanstal-
ten Nürnberg , für die Überlassung des The -
mas und die Übernahme des Referates zur vor-
liegenden Arbeit zu danken .

Herrn Dr. H i l l e r bin ich zu gros-
sem Dank verpflichtet für die Unterstützung
bei der Durchführung der erforderlichen Labor-
arbeiten .

L E B E N S L A U F .

Geboren am 28. August 1930 in Eger (Sudetenland), besuchte ich in den Jahren 1936 bis 1940 die Volksschule und in den Jahren 1940 bis 1945 das humanistische Gymnasium in Eger. Im Zuge der Ausweisung der Sudetendeutschen aus der Tschechoslowakei übersiedelte ich 1945 nach Neustadt a.d. Waldnaab. 1946 verzog ich von dort nach Pfreimd, Oberpfalz, meinem heutigen, ständigen Wohnsitz. Im gleichen Jahre trat ich in die 5. Klasse des humanistischen Gymnasiums Weiden ein und legte an der gleichen Anstalt im Sommer 1949 die Reifeprüfung ab.

Nach einem halbjährigen Aufbaudienst an der Außenstelle der medizinischen Fakultät der Universität München in Regensburg, begann ich dort im Mai 1950 das Studium der Medizin. Im Oktober 1952 unterzog ich mich der ärztlichen Vorprüfung und setzte anschließend mein Studium von November 1952 bis Juli 1953 an den Universitäten Erlangen und Hamburg fort. Seit November 1953 studiere ich wieder an der Universität Erlangen.

Photodruck von  **Toni** ERHARDT

